

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 64-027484

(43)Date of publication of application : 30.01.1989

(51)Int.CI.

C12P 9/00

C12P 19/00

(21)Application number : 63-104483 (71)Applicant : BIOEUROPE SA

(22)Date of filing : 28.04.1988 (72)Inventor : PRADINES ANTOINE
ALAN CRAVE
JACQUES PURI
PIERRE MONSAN

(30)Priority

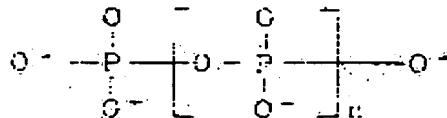
Priority number : 87 8705999 Priority date : 28.04.1987 Priority country : FR

(54) ENZYMIC PHOSPHORYLATION OF ORGANIC HYDROXYL COMPOUND BY
ALKALINE PHOSPHATASE DERIVED FROM CALF INTESTINE

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce a phosphate derivative of a hydroxyl compound by reacting an organic hydroxyl compound with a phosphate donor and an alkaline phosphatase derived from a calf intestine in the presence of an enzyme.

CONSTITUTION: The phosphorylating reaction of an organic hydroxyl compound with a phosphate donor [which is a phosphate, a pyrophosphate or a polyphosphate represented by formula I [(n) is 0-74]] and an alkaline phosphatase derived from a calf intestine is carried out in the presence of an enzyme at pH4.5-9 to produce a phosphate derivative of the hydroxyl compound. Alcohols, diols, etc., are cited as the organic hydroxyl compound. A phosphate donor in which (n) is 1-4 is preferred as the phosphate donor and a pyrophosphate in which (n) is 1 is more preferred as the phosphate donor.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

⑯ 日本国特許庁 (JP) ⑯ 特許出願公開
 ⑰ 公開特許公報 (A) 昭64-27484

⑯ Int. Cl.⁴
 C 12 P 9/00
 19/00

識別記号 庁内整理番号
 7236-4B
 7236-4B

⑯ 公開 昭和64年(1989)1月30日
 審査請求 未請求 請求項の数 7 (全7頁)

⑯ 発明の名称 子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼによる有機ヒドロキシル化合物の酵素リン酸化方法
 ⑰ 特願 昭63-104483
 ⑰ 出願 昭63(1988)4月28日
 ⑰ 优先権主張 ⑰ 1987年4月28日 ⑰ フランス(FR) ⑰ 87-059994
 ⑯ 発明者 アントワーヌ・プラディエヌ フランス国, 31400 トゥルーズ, アヴニュ・アリストイド・ブリアン, 18
 ⑯ 発明者 アラン・クレーブ フランス国, 31320 カスタネ, ヴィグレーオージル, アヴニュ・デ・ピレネ (番地なし)
 ⑯ 出願人 ピオヨローブ フランス国, 31400 トゥルーズ, アンバス・ディディエルドラ4
 ⑯ 代理人 弁理士 松井 政広 外1名
 最終頁に続く

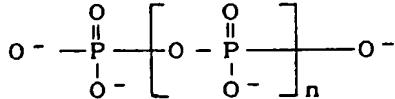
明細書

1. 発明の名称

子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼによる有機ヒドロキシル化合物の酵素リン酸化方法

2. 特許請求の範囲

(1) 有機ヒドロキシル化合物、ホスフェートドナーー〔ここで、該ホスフェートドナーーは次式、



(式中、nは0~74である)で示されるホスフェート、ビロホスフェートまたはポリホスフェートである〕および子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼをpH4.5~9で使用することにより酵素によるリン酸化反応を行うことを特徴とするヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法。

(2) pHは5.3~8.0の範囲内であることを特徴とする請求項(1)記載のヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法。

(3) nが1~4である前記式で示されたホスフェートドナーを使用することを特徴とする請求項(1)または(2)記載のヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法。

(4) ホスフェートドナーとしてビロホスフェート(n=1)を使用することを特徴とする請求項(3)記載のヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法。

(5) 反応媒体の容積に対する有機ヒドロキシル化合物の割合が40vol%~70vol%の範囲内であることを特徴とする請求項(1)~(4)の何れかに記載のヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法。

(6) 有機ヒドロキシル化合物はアルコール類、ジオール類、ポリオール類、糖類、糖誘導体類、ペプチド類およびタンパク質類から選択されることを特徴とする請求項(1)~(5)の何れかに記載のヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法。

(7) 有機ヒドロキシル化合物はグリセロールまた

はエチレングリコールであることを特徴とする請求項(6)記載のヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼによる有機ヒドロキシル化合物の酵素リン酸化方法および該方法により得られたリン酸化化合物に関する。

アルカリホスファターゼによる様々な酵素リン酸化が既に行われている。

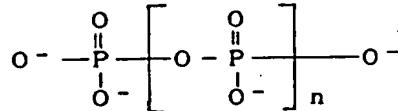
例えば、Martinekらは、Bioorg. Khim., 3, 696 (1977) に、二相媒体(水/クロロホルム)中で、中空纖維に結合された、ヒヨコの腸に由来するアルカリホスファターゼを、240単位/mg(以下「U/mg」と略す)の濃度で使用し、グリセロールおよびテトラブチルアンモニウムホスフェートから、グリセロホスフェートを30%台の収率で合成したことを開示している。

前記の研究について、W. B. Anderso

nおよびR. C. Nordlieは、The Journal of Biological Chemistry, vol. 242, No. 1, p. 114~149 (1967) に、ドナーとしてビロホスフェートを使用し、精製大腸菌アルカリホスファターゼによるグルコースのリン酸化を報告している。しかし、ホスフェート転移収率は、加水分解収率の91%に対して、僅か8%である。このため、前記文献に開示された方法は工業的な観点からは殆ど魅力がない。

本発明者らは、驚くべき事に、子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼを使用することにより、特定のヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体を高収率で合成できることを発見した。

従って、本発明の目的は、有機ヒドロキシル化合物、ホスフェートドナー【ここで、該ホスフェートドナーは次式、



(式中、nは0~74である)で示されるホスフェート、ビロホスフェートまたはポリホスフェートである】および子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼをpH4.5~9で使用することにより酵素によるリン酸化反応を行うことを特徴とするヒドロキシル化合物のホスフェート誘導体の製造方法を提供することである。

本発明の方法において、子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼ(酵素カタログ(以下「E.C.」と略す)3.1.3.1)、リン酸モノエステルヒドロラーゼは逆方向に作用する。

本発明の利点の一つは、子牛の腸から抽出されたアルカリホスファターゼを高度に精製する必要がないことである。従って、10~30U/mg程度の活性を有する、通常の純度の、子牛の腸から抽出されたアルカリホスファターゼを使用することができる。このようなアルカリホスファターゼは市販されている。例えば、シグマ社からE.C. 3.1.3.1, 検索番号P7640として市販されている。所望により、高活性のアルカリ

ホスファターゼも当然使用できる。しかし、高活性アルカリホスファターゼを使用したからといって必ずしも良好な結果が得られるわけではない。

本発明の反応は、アリコール類、ジオール類、ポリオール類、糖類、糖誘導体類、ペプチド類およびタンパク質類のような極めて広範な有機ヒドロキシル化合物について実施できる。しかし、ヒドロキシル化合物は酵素を阻害する可能性のある反応性基(例えば、アミノアルコール類)を含有していてはならず、また、チオールのような、リン酸化に対して本来的に無反応なものであってはならない点について注意する必要がある。所定のヒドロキシル化合物が本発明の方法によりリン酸化することができるか否か、簡単な常用試験により決定することができる。反応媒体中のヒドロキシル化合物の濃度は広範囲にわたって変化させることができるが、全反応混合物に対して、40~70mol%の濃度が好ましい。

本発明の反応は酵素が活性を維持するpH範囲内、すなわち、酸性過ぎず、また、アルカリ性過

きない pH 値で実施しなければならない。4.5 ~ 9 の pH 範囲が一般的に好ましく、最良の結果は通常、5.3 ~ 8.0 の範囲内の pH 値で得られることが発見された。

また、本発明の反応は酵素の活性に悪影響を及ぼさない温度で実施しなければならない。15 ~ 50°C の範囲内の温度が望ましい。30 ~ 40°C の範囲内の温度が一層好ましい。

反応時間は反応条件、工程の連続性または不連続性、反応させるヒドロキシル化合物のタイプ等により広範囲にわたって変化する。しかし、一般的には、約 1 時間 ~ 100 時間の範囲内である。

ホスフェート、ピロホスフェートまたはポリホスフェートの使用量は本発明の必須要件ではない。所望のリン酸化に必要十分な量を使用すればよい。

酵素の割合も広範囲にわたって変化させることができる。一つの指標として、反応媒体 1 mLあたりの酵素活性が 5 単位程度から 100 単位以上を使用することができる。しかし、酵素を過剰量使用しても何の利点もない。

保持されないが、エステルおよびホスフェートは樹脂に結合したまま残留する。

次いで、溶離剤として、重炭酸トリエチルアンモニウムを主成分とする揮発性緩衝液を使用し、樹脂を溶離した。この揮発性緩衝液は真空中で蒸発させることにより容易に除去され、また、リン酸エステルおよびトリエチルアンモニウム塩の形のリン酸塩を得ることを可能にする。

溶離は、TEAB に対して 150 mM から 250 mM までの濃度勾配を有する緩衝液を使用し、pH 8.8 で実施した。最初の画分は主にリン酸エステルを含有しているが、後の画分はリン酸塩とエステルの混合物を含有している。

これらの最初の画分について 31 P-NMR により分析したところ、 α - および β -グリセロホスフェート異性体の存在が確認された。また、同定されていないが、二種類のその他のリン酸化化合物が極めて低濃度で存在することも確認された。

ピロホスフェートおよび不純物は、アンモニア溶液を添加することにより、反応媒体の pH を 1

以下、実施例により本発明の方法を例証する。下記の実施例は本発明の範囲を何ら限定するものではない。

実施例 1 グリセロールからの α -グリセロホスフェートの製造

グリセロール 55%、ピロリン酸ナトリウム(以下「PP.i」と略す) 100 mg および子牛の腸に由来するアルカリホスファターゼ(活性: 1 ~ 3 U/mg) 30 mg を含有する水性反応媒体 3 mL を管内で、ゆっくりと攪拌しながら、37°C で 48 時間反応させた。5 ミリモルの MgCl₂ · 6 H₂O が添加された適当な緩衝液により媒体の pH を 3.7 ~ 9.90 の範囲内の値に調整した。

反応開始から 48 時間経過後、反応媒体を限外ろ過し酵素を分離し、そして、ろ液をファルマシア社製の DEAE セファデックス A-25 アニオニン交換樹脂に移した。

グリセロールを除去するために樹脂を最初、水で洗浄した。かくして、グリセロールは樹脂上に

0 まで増大させることにより沈殿させた。約 10 時間後、5°C の範囲内の温度で沈殿が起こった。

上澄液は所望の生成物、すなわち、 β -グリセロホスフェート異性体を含有していた。

使用した各 pH 値について、消費されたピロホスフェート(PP.i)の割合、加水分解収率および PP.i からホスフェートへの転移収率を測定した。これらの収率は消費された PP.i の % に基づいて算出した。加水分解収率は酵素の加水分解酵素活性に左右されるが、転移収率は酵素のリン酸転移酵素活性に左右される。言うまでもなく、できるだけ高い転移収率を有することが好ましい。試験された様々な pH 値について得られた結果を下記の表に要約して示す。

pH	PP.i 消費率 (%)	加水分解収率 (%)	転移収率 (%)
3.7	4.3	4.3	0.0
4.5	70.0	48.4	22.0
5.38	100.0	56.4	43.6
6.40	100.0	53.6	46.4
6.82	100.0	43.9	56.1
7.95	100.0	44.0	56.0
8.94	78.7	44.4	34.3
9.90	10.6	5.5	5.1

前記の表から明かなように、優れた結果は4.5~約9の範囲内のpH値、特に、約5.3~約8の範囲内のpH値で得られ、最適な結果は約6.8~約8の範囲内で得られる。

実施例2 各種アルカリホスファターゼの活性の比較

由來の異なる二種類のアルカリホスファターゼの活性と比べて、子牛の腸に由來するアルカリホスファターゼの活性が高いことを実証するために、グリセロールのリン酸化反応の比較反応速度試験を行った。実施した全ての試験について、総容量が3mlの反応媒体を使用した。この反応媒体はグリセロール8.0vol%、ピロリン酸ナトリウム1.00mgおよびアルカリホスファターゼ350単位を含有しており、pH値は、5ミリモルのMgCl₂・8H₂Oが添加された適当な緩衝液により7.9に調整されている。反応の進行は、³¹P NMRで37°Cで10分間毎に反応媒体のスペクトルをとることにより700分間にわたって追跡した。使用された各酵素について、時間

に対する、消費されたPPiの割合、加水分解収率および転移収率をプロットして特性曲線を描いた。得られた結果は下記の通りであった。

試験A：子牛の腸から抽出したアルカリホスファターゼ（シグマ社の市販製品No. P7640），E.C.3.1.3.1.；

測定比活性：タンパク質の12U/mg

PPi消失の初期速度：0.0150% s⁻¹

加水分解の初期速度：0.0087% s⁻¹

転移の初期速度：0.0062% s⁻¹

注記：これらの速度は前記の三本の曲線の原点におけるタングジェントにより得られる。

37°Cで700分間反応させた後の反応の進行度合（%）：

消費されたPPiの割合：92.8%

加水分解収率：39.4%

転移収率：53.4%

試験B：大腸菌アルカリホスファターゼ（シグマ社の市販製品No. P7640），E.C.3.1.3.1.；測定比活性：タ

ンパク質の217U/mg

PPi消失の初期速度：0.0055% s⁻¹

加水分解の初期速度：0.0038% s⁻¹

転移の初期速度：0.0017% s⁻¹

37°Cで700分間反応させた後の反応の進行度合（%）：

消費されたPPiの割合：57.1%

加水分解収率：28.4%

転移収率：28.7%

試験C：ヒヨコの腸から抽出したアルカリホスファターゼ（シグマ社の市販製品No. P8008），E.C.3.1.3.1.；測定比活性：タンパク質の15U/mg

PPi消失の初期速度：0.0022% s⁻¹

加水分解の初期速度：0.0015% s⁻¹

転移の初期速度：0.0007% s⁻¹

37°Cで700分間反応させた後の反応の進行度合（%）：

消費されたPPiの割合：6.9%

加水分解収率：3.4%

転移収率：3.5%

試験A～試験Cの各々において、 β -グリセロホスフェート異性体（第2位でリン酸化されたグリセロール）に対応する微弱な³¹P NMR信号の存在が注目されるが、5%以上の転移収率を示すものではない。

これらの試験について得られた結果から明かなように、反応の進行度合は酵素により異なり、また、大腸菌アルカリホスファターゼおよびヒヨコの腸から抽出したアルカリホスファターゼに比べて、子牛の腸から抽出したアルカリホスファターゼの活性は相当高いことが実証されている。

また、子牛の腸から抽出したアルカリホスファターゼを使用した場合、大腸菌アルカリホスファターゼを用いた反応に比べて、転移の初期速度は4倍も高い。ヒヨコの腸から抽出したアルカリホスファターゼの場合の転移初期速度は極めて低い値にとどまる。

更に、子牛の腸から抽出されたアルカリホスフ

エートの消費率が増大するが、特に、PPI および短鎖ポリホスフェートの転移収率が著しく増大する。

前記のような転移収率の増大は、反応媒体中に事前に生成されたホスフェートに基づいてグリセロールがリン酸化されることによってのみ説明できる。実際、反応開始から 48 時間経過後に PPI が 9.4% も残ることは、前記のような転移収率の増大を説明するには不十分である。

これらの試験結果に統いて、リン酸化剤としてリン酸ナトリウム (Pi) およびビロリン酸ナトリウム (PPI) によるグリセロールのリン酸化の比較試験を、実施例 2 に述べた実験条件と同様な実験条件を用いて実施した。ただし、反応は 2 時間 40 分間にわたって行い、反応媒体の 31P NMR スペクトルを 10 分間毎にとった。

得られた測定結果を下記の表に要約して示す。

反応時間 (min)	ホスフェートドナー			
	ビロスフェート (PPI)		ホスフェート (Pi)	
	PPI 消費率 (%)	加水分解率 (%)	転移率 (%)	転移率 (%)
0	0	0	0	0
20	10.0	6.0	4.0	0
30	16.4	10.2	6.2	0
40	22.5	12.5	10.0	1.0
60	32.0	19.0	13.0	3.1
80	38.0	21.5	16.5	4.5
100	43.8	24.0	19.8	5.5
120	49.0	26.0	23.0	8.0
140	53.5	29.0	24.5	10.4
160	56.0	30.8	25.2	11.2

これらの実験から理解されるように、ホスフェート Pi がグリセロールに転移される。しかし、前記の結果および前記の実験と一緒に行った反応速度実験の結果から明らかなように、

- (i) 転移の初期速度はドナーとして PPI を使用したほうが 3.5 倍も速く、しかも、
- (ii) 特に、Pi の場合には 30 分間の潜伏期が存在するが、PPI については、このような潜伏期は認められなかった。

この実験で得られた結果から極めて明確に理解されるように、Pi の代わりにドナーとして PPI を使用すると、ホスフェート残留物の転移が促進される。

実施例 5 エチレングリコールからモノリン酸エチレングリコールの製造

グリセロールの代わりに、エチレングリコールを、反応媒体の容量を基礎にして、40~90% の割合で使用したこと以外は、実施例 1 に述べた実験条件と同様な実験条件を使用し、モノリン酸エチレングリコールを製造した。反応開始から 48 時間後に、消費された PPI の割合、加水分解収率および転移収率を測定した。得られた結果を下記の表に要約して示す

エチレングリコール 使用量(%)	PPI 消 費率(%)	加水分解 収率(%)	転移収率 (%)
40	100.0	65.7	34.3
50	100.0	59.7	40.3
60	100.0	41.5	58.5
70	48.6	26.2	22.4
80	6.2	3.9	2.3
90	3.7	2.5	1.2

前記の結果から明らかなように、エチレングリ

コールの使用量が 40~60 vol% の範囲内の場合には、PPI が 100% 消費される。また、エチレングリコールの濃度が高くなるにつれて、加水分解収率が低下する。

エチレングリコールの使用量が 40~70 vol% の場合には、転移収率も良好であり、エチレングリコール濃度が 60 vol% の時の 58.5% を最大値として低下していく。

実施例 6 その他のヒドロキシル化合物のリン酸化

本発明の方法が様々なタイプのヒドロキシル化合物のリン酸化に適用できることを実証するために、グリセロールの代わりに、同一割合の他のヒドロキシル化合物を使用したこと以外は実施例 1 の実験条件を用いて一連のテストを行った。使用されたヒドロキシル化合物、消費された PPI の割合および得られた加水分解収率並びに転移収率を下記の表に示す。

ヒドロキシル化合物類	PPI 消費率 (%)	伝 收 率 (%)	移 率 (%)	加 分 水 解 率 (%)
D-グルコース	82.0	15.2	66.8	
D-リボース	66.0	9.4	58.6	
アルコール類				
CH ₃ -CH(OH)-C=CH	83.3	12.1	71.4	
CH ₂ =CH-CH ₂ OH	53.5	9.8	43.7	
ジオールおよびメタオール類				
OHCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	100.0	51.4	48.6	
OHCH ₂ CH ₂ OH	56.4	19.5	36.9	
OHCH ₂ CHOHCH ₃	61.2	15.6	45.6	
OHCH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	62.2	20.2	42.0	
OHCH ₂ CH ₂ O(CH ₂ CH ₂)				
2-OCH ₂ CH ₂ OH	66.9	11.4	55.5	
OHCH ₂ CH ₂ OCH ₂ -				
CH ₂ OH	53.2	16.6	36.6	
CH ₃ CH(OH)CH ₂ CH ₃	71.0	12.2	58.8	
OH(CH ₂ CH ₂ O) ₂ CH ₂ -				
CH ₂ OH	60.5	11.4	49.1	
OHCH ₂ CH(OH)CH ₂ CH ₂ OH	100.0	52.1	47.9	
OHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	58.0	18.7	39.3	
OHCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -				
CH ₂ OH	64.5	29.5	35.2	
OHCH ₂ CH=CHCH ₂ OH	78.8	26.0	52.8	
OHCH ₂ CH ₂ SCH ₂ -				
CH ₂ OH	86.0	31.3	54.7	
OHCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH-				
CH(OH)CH ₂ OH	91.3	21.1	70.2	

これらのテストは単に、本発明の方法の実行可能性を実証するために行われたものであり、作業条件を最適化させるものではないことに留意しなければならない。

この明細書に開示された実施態様は単なる具体例であり、特に、本発明の範囲を逸脱することなく、技術的な均等物に置き換えることにより、如何様にも変更可能なことは自明である。

特許出願人 ビオヨロープ

代理人 弁理士 松井政広
弁理士 千葉博史

第1頁の続き

②発明者 ジヤツク・プリ

フランス国, 31320 カスタネ, ヴィグレーオージル,
ル・カティラ (番地なし)

②発明者 ピエル・モンサン

フランス国, 31700 ブラニヤツク, モンドンヴィユ, ル
ヌフェイユ (番地なし)